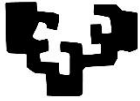


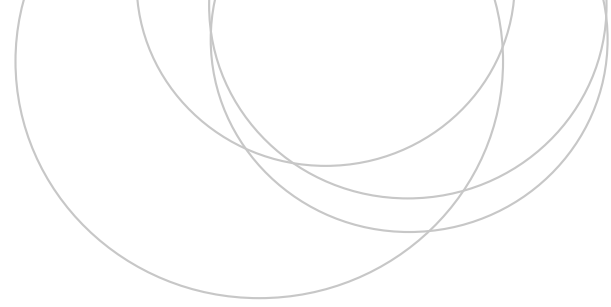
eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biologiako Gradua / Grado en Biología

Sobreexpresión de PTEN como terapia preventiva en cáncer

Egilea/Autor/a:
Joseba Elizazu Pérez
Zuzendaria/Director/a:
Ainhoa Iglesias Ara

© 2019, Joseba Elizazu Pérez

Leioa, 2019ko otsailaren 21a /Leioa, 21 de Febrero de 2019

ÍNDICE

1.	RESÚMENES	1
1.1.	ABSTRACT	1
1.2.	RESUMEN	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	GENES QUE PORTAN MUTACIONES FRECUENTES EN EL CÁNCER	4
3.1.	PTEN	5
3.2.	INTERACCIONES DE PTEN CON OTRAS RUTAS Y ONCOGENES O SUPRESORES DE TUMORES.	7
a)	BRCA1	8
b)	KRAS	8
c)	MYC	9
4.	OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS CONCRETOS:	11
5.	MÉTODO EXPERIMENTAL	12
5.1.	OBTENCIÓN DE CÉLULAS INMORTALIZADAS	12
5.2.	EXPRESION REGULADA DE PTEN CON EL SISTEMA TET-On	12
a)	Introducción del vector regulador en las células.	13
b)	Selección de líneas celulares transfectadas	13
c)	Transfección del vector de expresión	13
d)	Comprobación de la expresión inducida de PTEN	14
5.3.	ALTERACIÓN DEL GEN DE INTERÉS	14
a)	BRCA1	14
b)	KRAS	16
c)	MYC	16
d)	PIK3CA	17
5.4.	COMROBACIÓN DE LAS ALTERACIONES	18
5.5.	PRUEBA DE MIGRACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR	18
a)	Ensayo de proliferación celular <i>in vitro</i>	19
b)	Ensayo de migración e invasión celular <i>in vitro</i>	19
6.	CONCLUSIÓN, RESULTADOS ESPERADOS Y BENEFICIO DEL PROYECTO.....	20
7.	BIBLIOGRAFÍA	21

1. RESÚMENES

1.1. ABSTRACT

The cancer is, undoubtedly, one of the most challenging disease being faced by the biomedical research. There are plenty of genes on which the scientific community is working on, and in many cases it has been shown that some of those genes are involved in most types of cancer. This statement leads to think that alterations in those genes have a mayor importance in the development of tumors, even when the mutation itself is not directly bounded to the starting event of the oncogenesis. PTEN gene is a good representative of those genes, as it is the second most frequently mutated tumor suppressor gene in cancer, just behind p53. Nearby in 30% of cancers mutations on PTEN can be found. The protein encoded by this gene (PTEN) plays a key role in the regulation of one of the most important signaling pathway in cell metabolism, growth, proliferation and migration — the PI3K/AKT pathway. In addition to be the direct responsible of the cancer, as it is in the Cowden syndrome, loss of PTEN function is a mayor determinant in the tumor growth. Here we hypothesize that PTEN overexpression might prevent tumor growth and metastasis in cells harboring mutations on genes deeply involved in cancer — BRCA1, KRAS, MYC and PIK3CA. Therefore, we purpose to prevent cancer growth mediated by these genes through the overexpression of PTEN. In order to fulfil that goal, we propose the following pilot project — a copy of PTEN under inducible expression with Tet-On system will be introduced in an immortalized cell line. Then we will introduce mutations in several oncogenes and tumor suppressors. As a means of mimicking the most common mutations in those genes, extra copies of the two commonly amplified genes — MYC and PIK3CA — harbored in high expression vectors will be transfected. Coding regions of the remaining two — BRCA1 and KRAS — will be edited by the CRISPR/Cas9 system, so the most common mutations can be expressed in the cells. In order to test the functional consequences of these alterations, cell proliferation and cell migration will be our read-outs. If our hypothesis is correct, overexpressing PTEN should prevent proliferation and migration capacities showed by cell cultures harboring the most common mutations in cancer. If this proof-of-concept project is positively fulfilled, it would open a window in therapy whereas preventing oncogenesis driven by different genes could be feasible changing the regulation of one.

Key words: PTEN, Cancer, Overexpression, PIK3, AKT, Myc, BRCA1, KRAS.

1.2. RESUMEN

El cáncer es, sin duda, una de las enfermedades que mayores retos presenta en la investigación biomédica. Son muchos los genes involucrados en el cáncer con los que se está investigando, y en muchos casos se ha observado que algunos genes aparecen mutados en una gran parte de los tumores, lo que da a entender que la alteración de estos genes puede ser clave en el desarrollo de gran parte de los tumores, aun cuando no esté directamente ligada al inicio de la formación del tumor. Un claro ejemplo de este grupo es el gen PTEN, el segundo supresor tumoral más mutado en el cáncer, por detrás de p53. Se estima que se pueden encontrar mutaciones somáticas de PTEN en el 30% de los cánceres. La proteína codificada por este gen (PTEN) tiene un papel central en la regulación de una de las rutas de señalización más importantes en el metabolismo, crecimiento, proliferación, supervivencia y migración: la ruta PI3K/AKT. Por ello, además de ser la causante del síndrome de Cowden, la pérdida de función de PTEN es un evento importante en el desarrollo y migración tumoral. Por ello, en este trabajo se plantea la hipótesis de que la sobreexpresión de PTEN pueda prevenir el crecimiento tumoral y metástasis en células portadoras de mutaciones en genes relacionados con el cáncer, concretamente en los genes BRCA1, KRAS, MYC y PIK3CA. Por tanto, nos planteamos como objetivo prevenir el desarrollo del cáncer en las vías de los genes nombrados mediante la sobreexpresión de PTEN. Con este objetivo, se introducirá una copia de PTEN con un sistema de expresión inducible Tet-On en una línea celular inmortalizada, y luego se introducirán las mutaciones en oncogenes y supresores tumorales. Con el fin de imitar las mutaciones más comunes en estos genes, se introducirá una copia extra de los genes comúnmente amplificados (MYC y PIK3CA) en un vector de alta expresión. Se editarán las regiones codificantes de los dos restantes (BRCA1 y KRAS) con el sistema CRISPR/Cas9, de modo que se expresen las mutaciones más comunes. Con el objetivo de testar las consecuencias funcionales de las alteraciones, realizaremos ensayos de migración y proliferación celular. Si nuestra hipótesis es correcta, sobreexpresar PTEN debería evitar la capacidad proliferativa y migratoria mostrada por los cultivos celulares que alberguen las mutaciones más comunes en el cáncer. Si esta prueba de concepto tuviera resultados positivos, se abriría una nueva ventana en la terapia por medio de la que prevenir la oncogénesis guiada por diferentes genes pudiera ser factible cambiando únicamente la regulación de uno de ellos.

Palabras clave: PTEN, Cáncer, sobreexpresión, PI3K, AKT, Myc, BRCA1, KRAS.

2. INTRODUCCIÓN

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de EEUU y la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), el cáncer se define como un conjunto de más de 200 enfermedades relacionadas en las que algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos circundantes. Puede empezar en cualquier lugar del cuerpo, cuando el proceso natural y ordenado de crecimiento, división y muerte de células se descontrola, de modo que las células que acumulan daños en el DNA, en vez de morir, sobreviven y forman células nuevas. Cuando se acumulan estas divisiones, las células pueden formar masas llamadas tumores.

Debido a la diversidad y complejidad que presenta esta enfermedad principalmente en cuanto a su patogenia y a su etiología, es sumamente complicado entender cuáles son sus mecanismos para poder desarrollar un tratamiento eficaz. Los principales tratamientos hasta ahora son la radioterapia, quimioterapia y cirugía, aunque son ineficaces contra los cánceres más agresivos en estados avanzados. Incluso, son tratamientos considerablemente invasivos, ya que pueden dañar los tejidos alrededor del tumor, o por ser inespecífico, como ocurre con la quimioterapia. Por esto, urge, primero, entender los mecanismos por los que se crea el cáncer, y segundo, encontrar tratamientos que sean más eficaces y menos invasivos para cualquiera que sea el estado de la evolución del cáncer. Uno de los tratamientos en desarrollo más prometedores es la terapia génica, la cual pretende en esencia introducir genes específicos para recuperar la función normal de la célula (NCI).

Para la creación de células cancerígenas, es necesario que los genes que regulan procesos como el crecimiento, división y diferenciación celular estén desregulados o alterados. Estos genes están clasificados en dos categorías: por un lado, los oncogenes, que son los genes que fomentan el crecimiento y la proliferación celular, y por otro, los genes supresores de tumores, los que inhiben la división y proliferación celular. Normalmente se necesita más de un gen mutado para el desarrollo del cáncer (Knudson, 2011). Además, una vez se fijan las alteraciones que dan inicio a la oncogénesis, a medida que las células se dividen y se forma el tumor, se siguen acumulando daños en el ADN y se producen cambios en los oncogenes y los supresores de tumores que favorecen al desarrollo del cáncer.

Se ha propuesto usar como diana terapéutica los genes y proteínas relacionados con las rutas de transducción celulares relacionadas con el metabolismo, crecimiento, proliferación y migración celular; entre ellas, la ruta PI3K/AKT (Xia & Xu, 2015), relacionada, en mayor o menor medida, con todos los parámetros anteriormente nombrados (Figura 1). En células no cancerígenas, ante estímulos concretos que activan receptores de la membrana plasmática, se estimula la enzima fosfoinositol 3-

quinasa (PI3K), que se encarga de la fosforilación de fosfatidinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3) (Wang et al, 2015). El PIP3 es la principal forma de activación de la proteína quinasa B (también llamada AKT), que, a su vez, mediante diferentes rutas, induce la supervivencia y proliferación celular. El principal regulador de esta ruta es la proteína PTEN (phosphatase and tensin homolog), codificada por el gen PTEN, que contrarresta la acción de PI3K al catalizar la reacción opuesta (de PIP3 a PIP2). Entre los supresores de tumores más comúnmente mutados en el cáncer, PTEN ocupa el segundo puesto, detrás de p53 (McLoughlin et al, 2018).

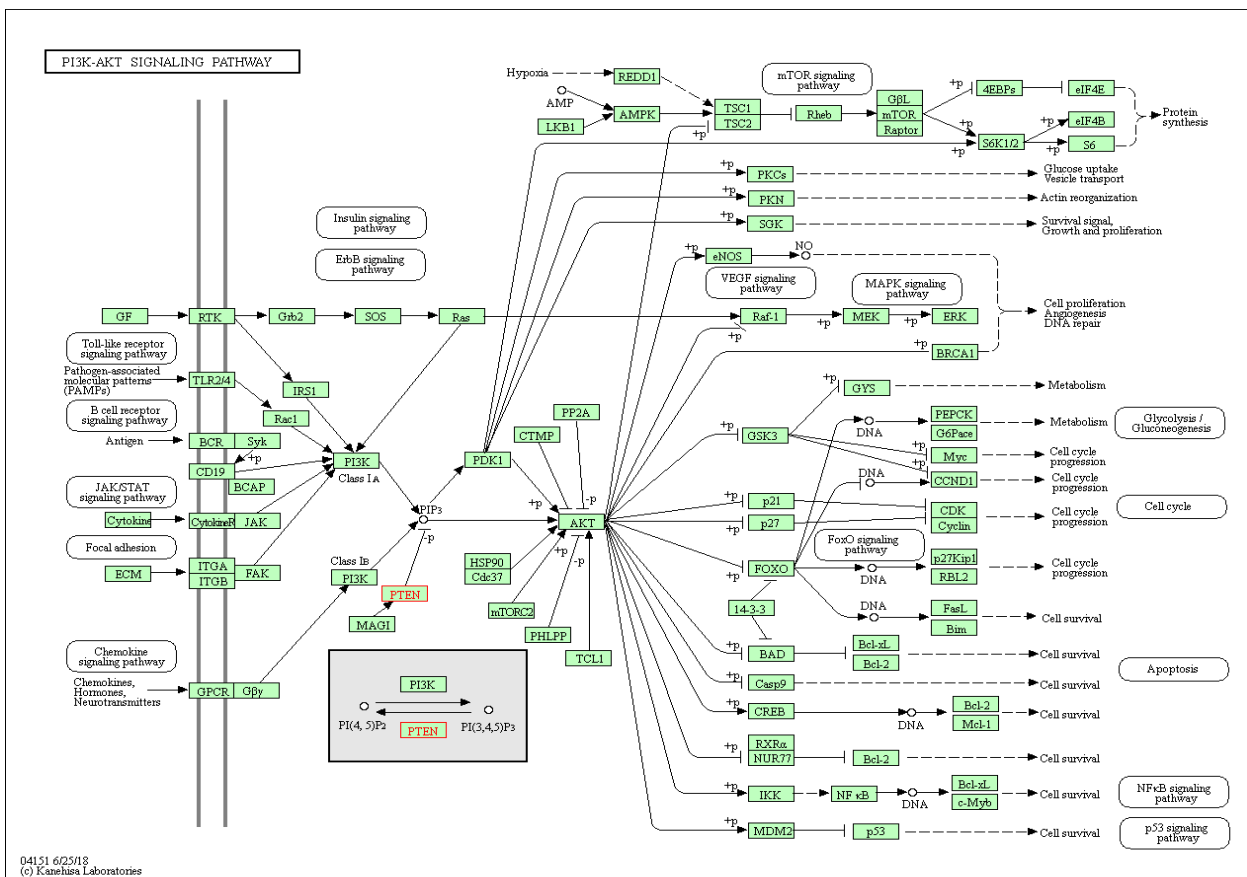


Figura 1: Diagrama de KEGG de la ruta PI3K/AKT, con sus interacciones y funciones en los procesos celulares.

3. GENES QUE PORTAN MUTACIONES FRECUENTES EN EL CÁNCER

A continuación, se revisarán PTEN y la interacción de varios genes importantes responsables de distintos cánceres que tienen relación directa con PTEN.

Como ya se ha mencionado, la ruta PI3K es una diana clave para la oncogénesis, ya que participa, mediante diferentes rutas tanto previas a la activación de AKT como anterior a la activación de PI3K, en procesos claves en el funcionamiento de la célula como el metabolismo, crecimiento, proliferación,

supervivencia y migración (Hopkins et al, 2014). Como muestra, los genes que actúan en esta ruta suelen aparecer alterados en los tumores ya formados, lo que indica que la desregularización de la ruta es un factor importante en la evolución del cáncer, ya que en un estado en el que la enzima AKT esta activada por encima de lo normal se favorecen los procesos mencionados (Engelman, 2009). Por ejemplo, PIK3CA (el gen que codifica la subunidad catalítica de PI3K), según COSMIC, puede mostrar diferentes alteraciones en distintos tipos de cáncer: puede estar sobreexpresado (en el cáncer de ovario en el 49,25% de los casos, mientras que en los cánceres de esófago, cuello uterino y pulmón supera el 30%), con mutaciones puntuales (en el cáncer de mama y de endometrio en el 27 y 24% de los casos, respectivamente), o puede tener variaciones en el número de copias (en el cáncer de cérvix, pulmón y en la parte superior del tracto aerodigestivo esta amplificado en el 13-19% de los casos).

Las tres formas de AKT (AKT1, AKT2, AKT3), codificada por tres genes distintos, suelen aparecer sobreexpresadas, en proporciones diferentes, en varios tipos de cáncer. La que más comúnmente aparece alterada es la AKT2, sobre todo en el cáncer de tracto urinario y de endometrio, en los que supera el 17% de los casos, y también en los cánceres de ovario, pulmón y páncreas, en los que se encuentra en el 10-15% de los casos (COSMIC).

3.1. PTEN

Además de estar frecuentemente alterado en gran parte de los cánceres, mutaciones de PTEN en la línea germinal son causantes del síndrome de Cowden (OMIM), enfermedad que se caracteriza por crear hamartomas (según el National Cancer Institute (NCI), “crecimiento benigno (no canceroso) compuesto por una mezcla anormal de células y tejidos”) y aumenta el riesgo de desarrollar otro tipo de cáncer (Eng, 2016). Se cree que la prevalencia de este síndrome es de alrededor de 1 entre 200.000 (según Genetics Home Reference). Este síndrome es el más conocido entre los diferentes síndromes de tumor hamartoma PTEN. Los pacientes con el síndrome de Cowden (Milella et al, 2015) tienen alto riesgo de desarrollar en algún momento tumores de seno (85%), tiroides (35%), riñón (carcinoma de células renales, 33%) y de endometrio (28%).

En dos estudios de 2000 y 2001 se estimó que podemos encontrar mutaciones somáticas de PTEN en el 30% de los tumores (McLoughlin et al, 2018). En el linfoma difuso de células B grandes, Abubaker et al (2007) describieron mutaciones en el gen PIK3CA en el 8% y pérdida de PTEN en el 37% de los casos. Ambas alteraciones se relacionaron con una alta mortalidad (Wang et al, 2015).

Compuesta por 403 aminoácidos, la proteína PTEN es una fosfatasa con actividad sobre proteínas y lípidos, y es prácticamente ubicua en los tejidos humanos. Su principal función reside en la hidrólisis del grupo sulfato de PIP2 en la membrana plasmática, como reguladora de la ruta PI3K/AKT. (Melilla et al, 2015). PTEN es una fosfatasa que contrarresta la fosforilación de PI3K. De esta manera, impide la activación de AKT por PIP3, ya que transforma el PIP3 producido por PI3K en PIP2. El PIP3 es principalmente la forma por la que se activa AKT, aunque es posible su activación mediante otras tirosina (Ack1/TNK2, Src, PTK6) y serina/treonina (TBK1, IKKε, DNAPKcs) quinasas que directamente activan AKT para inducir sus funciones pro-proliferativas (Mahajan, 2012).

Dada su función de fosfatasa de PIP3, PTEN cumple varias funciones celulares, entre ellos en la polaridad de la célula y migración, en el metabolismo y crecimiento y en el ciclo celular y auto-renovación de células madre (Worby & Dixon, 2014)

Esta ruta también cumple funciones importantes en la regulación del ciclo celular. Bajo estímulos de crecimiento y mitogénicos, las Y quinasas receptoras reclutan PI3K a la membrana celular, donde se activa la ruta. La AKT activa promueve la entrada a la fase S fosforilando e inhibiendo GSK3 β. Esta proteína activa inhibe la transición G1-S inactivando la ciclina D (Brandmaier, Hou & Shen, 2017).

Su actividad proteína fosfatasa, es fundamental para la inhibición de la migración celular regulada por PTEN. Por ejemplo, en células de glioma, para inhibir la migración es necesaria la fosforilación de PTEN llevada a cabo por la actividad fosfatasa de PTEN. También se ha observado que regula la migración de estas células reprimiendo la familia de quinasas Src (Hopkins et al, 2014).

PTEN cumple además varias funciones en el núcleo como supresor de tumores, y su ausencia se correlaciona con el desarrollo de cáncer más agresivo. Estas funciones son independientes de la defosforilación de PIP3 (Hou et al, 2017).

Debido a su función en la regulación de una ruta central para el metabolismo y proliferación celular, PTEN puede tener un papel importante a la hora de impedir el descontrol del ciclo celular inhibiendo la ruta PI3K/AKT, ya que incluso diversas mutaciones en genes pertenecientes a otras rutas pueden provocar la desregulación de esta ruta como pieza importante tanto para dar comienzo a la tumorigenesis como para acelerar el proceso. Este puede ser el motivo por el que los distintos genes pertenecientes a la ruta PI3K/AKT, incluido PTEN, suelen estar alterados en el cáncer.

3.2. INTERACCIONES DE PTEN CON OTRAS RUTAS Y ONCOGENES O SUPRESORES DE TUMORES.

Ya que la ruta PIP3/AKT está implicada en muchos procesos y rutas celulares, podemos deducir que si consiguiéramos reducir los niveles de activación de la proteína AKT podríamos regular a su vez distintos genes y rutas que tienen mayor importancia para los primeros pasos de la oncogénesis, reduciendo los niveles de activación de estas rutas y genes o reduciendo la activación de terceras enzimas que inhiben los supresores de tumores. Igualmente, si utilizamos la sobreexpresión de un gen PTEN exógeno como reguladora de AKT, también conseguiremos, por una parte, que sea más difícil que las dos copias de PTEN se muten y pierdan su función, por lo que favorecería la estabilidad de las células ante los procesos oncogénicos (García-Cao et al, 2017). Por otra parte, se podría impedir el desarrollo de tumores en los síndromes de tumor hamartoma PTEN restaurando la copia faltante de PTEN.

Los objetivos más interesantes de este método son las rutas en las que al menos uno de sus mecanismos oncogénicos se basa en la activación de la ruta PI3K/AKT por la sobre activación de PI3K. Un claro ejemplo es la familia de proteínas RAS (HRAS, KRAS y NRAS). Se ha estimado que la familia RAS está implicada en alrededor del 30% de los cánceres, con especial relevancia del gen KRAS, mutado en el 17%-25% de todos los cánceres y aproximadamente en el 30-40% del cáncer de colon, y además los cánceres con RAS mutado suelen ser resistentes a los tratamientos habituales (COSMIC).

A continuación, veremos otros genes que interactúan con la ruta PI3K/AKT (Figura 2), ya sea porque activan PI3K, o que para activarse necesitan interacción con la proteína AKT activada, o que dependen de alguna función (o ausencia de función) de PTEN independiente de la ruta para ejercer su

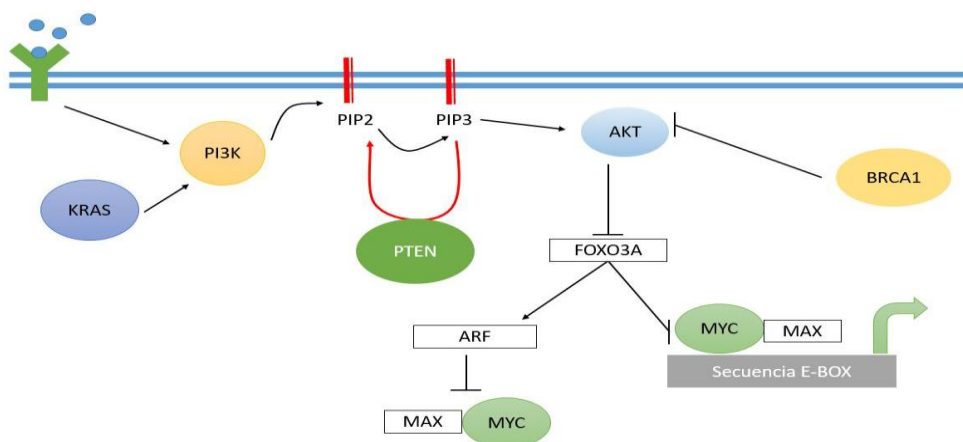


Figura 2: Ilustración de las interacciones de PTEN en las que se fundamenta este proyecto.

función oncogénica o supresora de tumores. Analizaremos también si una sobreexpresión de PTEN podría ser de ayuda para la estabilidad del ciclo celular en caso de que el gen en cuestión esté alterado.

a) BRCA1

BRCA1 (17q21.31) es un supresor de tumores, conocido por su incidencia e implicación en el cáncer de mama, que como parte de un complejo proteico repara los daños a cadena doble de DNA. En las células cancerígenas sin el BRCA1, se ha observado que la ruta PI3K/AKT está constitutivamente activada. También PI3K habitualmente esta constitutivamente activada en los cánceres de mama relacionados con BRCA1 (Minami et al, 2014).

Se cree que BRCA1 puede regular la ruta PI3K/AKT actuando en las quinasas *upstream* de AKT (Figura 2), ya que la sobreexpresión de BRCA1 reduce los niveles de AKT activada en las células MCF7 (línea celular del cáncer de mama). Por ello, es posible que la pérdida de función de BRCA1 pueda activar la ruta en favor de la proliferación de las células cancerígenas (Xiang et al, 2008). Hay que tener en cuenta también que en gran parte de los cánceres de mama con mutaciones en BRCA1 también tienen una alta probabilidad de tener PTEN mutado. Es posible que en ciertos cánceres asociados a BRCA1 la pérdida de PTEN sea el desencadenante de la formación del tumor.

Sin embargo, la activación de AKT también es beneficiosa para que BRCA1 ejerza su función, ya que es capaz de fosforilar BRCA1 impidiendo su degradación y la activación de AKT parece favorecer la localización de BRCA1 en el núcleo.

Contra el cáncer de seno, concretamente en los desarrollados a partir de alteraciones en BRCA1 (por ejemplo, en el 50% de los hereditarios), los tratamientos más utilizados son la cirugía y la quimioterapia, ambos con considerable impacto en el paciente. En una célula con mutaciones en la proteína BRCA1, aumentando los niveles de PTEN conseguiríamos reducir los niveles de activación de AKT, lo que, como mínimo, ralentizaría la formación del tumor. Además, podría ser útil frente a futuras posibles mutaciones que en células normales acelerarían el proceso (Xiang et al, 2011)

b) KRAS

KRAS (12p12.1) es una proteína G monomérica unida a la membrana, perteneciente a la subfamilia de proteínas Ras, y que se activa mediante factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF: Guanine-nucleotide Exchange Factor). Una vez activada, crea una ruta de transmisión

de señales celulares activando a su vez otras enzimas (Castellano & Downward, 2011). Esta ruta acaba induciendo la transcripción de distintos genes relacionados con el crecimiento celular, supervivencia, diferenciación...

Esta proteína tiene interacción directa con PI3K, concretamente con la subunidad p110 α en el dominio RBD (RAS- binding domain), necesaria para el desarrollo normal del linfangioma y la oncogénesis guiada por RAS. En la oncogénesis, la unión de RAS desregulada con PI3K provoca la activación de la ruta PI3K (Figura 2). En un estudio con ratones con mutaciones en RBD se ha observado que se aumenta la resistencia a formar tumores, pero debido a que esta unión es necesaria para la formación normal del organismo, era más difícil conseguir ratones adultos (Murillo et al, 2014). Por lo tanto, en un tejido con altos niveles de expresión de PTEN será más improbable que se desarrollen tumores relacionados con RAS y PI3K, dada su regulación reforzada de la ruta PI3K/AKT.

Otra ruta importante en la oncogénesis es la RAS/MAPK. En unos estudios, aunque la sobre activación de Ras en células prostáticas fuera suficiente para aumentar los niveles de MAPK, era insuficiente para inducir la proliferación celular significativamente, pero al incluir mutaciones en PTEN se desarrollaban tumores rápidamente (Mulholland et al, 2012).

Entre las mutaciones que se puedan encontrar en el gen KRAS, en este proyecto se trabajará sobre la mutación G12D (o c.35G>A) en el exón 2, que siendo una de las que más incidencia presentan en el cáncer colorrectal (entre el 33.5-34.4% de las mutaciones de KRAS en este cáncer son G12D (Chan, 2017)), tiene además impacto directo sobre la ruta PI3K/AKT, saltándose su regulación (Fan et al, 2008). Por ello, inducir una producción mayor de PTEN en las células con esta mutación podría impedir que se desregulara la ruta, y, en consecuencia, frenar la oncogénesis. La mutación KRAS G12D también tiene incidencia en el cáncer de ovario (donde representa el 41% de las mutaciones de KRAS, Khabele, 2017), en el cáncer de tiroides (25.2% de las mutaciones de KRAS, Espinosa et al, 2015) y en el cáncer de pulmón (17% de las mutaciones de KRAS, Lovly et al, 2017).

Diferentes estudios demuestran que en los pacientes con tumores que albergan mutaciones en el gen KRAS tienen menor sensibilidad a la terapia con anticuerpos anti-EGFR, ya sea en monoterapia o con quimioterapia (Chan, 2017).

c) MYC

MYC es el gen más frecuentemente amplificado en el cáncer humano (Kaur & Cole, 2013). Codifica el factor de transcripción MYC, que actúa en conjunto con la proteína MAX. Por su potente efecto oncogénico, en células normales está estrictamente regulado, tanto a nivel de transcripción

como de post- transcripción. Promueve la proliferación celular y la oncogénesis aumentando la expresión de E2F, Ciclina D y CDK4 (Xin et al 2017).

En relación a PTEN, c-Myc se estabiliza en cooperación con la ruta PI3K, además de con la MAPK (Ras-mitogen activated protein kinase). La activación de AKT inhibe la GSK3, que fosforila MYC y facilita la degradación proteosómica. AKT, junto a RAS, induce también la supresión de MAD, proteína que inhibe la transcripción mediada por MYC (Zhu et al, 2018). En células no cancerosas (Figura 2), los factores de crecimiento activan la expresión de MYC. Esta, se une a MAX para activar la transcripción de genes que favorecen la proliferación celular. ARF es capaz de inhibir esta acción de MYC, activando la muerte celular. La concentración del factor de transcripción FOXO3A en el núcleo también puede impedir el crecimiento, por una parte, activando ARF y por otra impidiendo directamente la transcripción por MYC/MAX. En este punto, AKT actúa como socio de MYC fosforilando e inhibiendo FOXO3A (Stine et al, 2015).

Una de las enfermedades relacionadas más conocidas con mutaciones de c-MYC es el linfoma de Burkitt, debido a la translocación recíproca t(8;14). En este tumor c-MYC se transloca con un gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH en inglés), en el cromosoma 14. Esto conduce a una expresión desregulada y constitutiva de c-MYC, por lo que se alcanzan niveles altos de expresión. Esta enfermedad hematológica de las células B se caracteriza por ser muy agresiva y por ser el tumor humano con mayor velocidad de crecimiento (Molyneux et al, 2012).

Elevando los niveles de PTEN en una célula con MYC amplificado, conseguiríamos aumentar la activación de FOXO3A reduciendo la de AKT, impidiendo así las interacciones MYC-MAX. Sin embargo, MYC favorece la transcripción del cluster miR-17 que impide la transcripción de PTEN (Dang, 2012). Por lo tanto, si se quisiera aumentar la cantidad de PTEN en células con altos niveles de MYC, se necesitaría también cambiar el 3'UTR de PTEN, para que el miRNA no pueda silenciarlo. En un estudio de Mihailovich et al de 2015, descubrieron que en células B tumorosas con el 3'UTR de PTEN más corto no tenían sitios de unión con el miRNA.

Entre otros métodos, se han propuesto como objetivos terapéuticos contra los cánceres mediados por MYC la inhibición farmacológica de la ruta PI3K/AKT/mTor (Chen et al, 2018) y la inhibición de la interacción MYC-MAX, clave para la expresión de genes regulados por MYC, lo que indica que el aumento de PTEN podría ser interesante para mantener la estabilidad celular en células que contengan el gen c-MYC desregulado, ya que de esta forma, aumentando los niveles de PTEN esperamos reducir la estabilidad del complejo MYC-MAX y la inhibición de la ruta PI3K/AKT, reduciendo el efecto de la amplificación de MYC.

4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS CONCRETOS:

Teniendo en cuenta que una gran parte de las mutaciones que predisponen a cáncer se encuentran principalmente localizadas en los genes detallados en el anterior apartado, y que estas vías tienen relación con el supresor tumoral PTEN, nos planteamos la hipótesis de que la sobreexpresión de PTEN podría prevenir el desarrollo de cáncer en las células portadoras de mutaciones en MYC, BRCA1, KRAS, PIK3CA y en el mismo PTEN. Por lo tanto, nos planteamos como objetivo prevenir el desarrollo del cáncer donde el *driver* lo componen genes de otras vías, mediante la sobreexpresión de PTEN. Este proyecto se fundamenta en la importancia de PTEN en regular distintas rutas celulares relacionadas con el cáncer para diseñar un posible tratamiento preventivo. Con este fin, se sobreexpresará PTEN en células portadoras de una mutación en uno de los genes anteriormente explicados, las cuales se introducirán en condiciones de sobreexpresión de PTEN. De esta manera, se evitarán los daños en el DNA que puedan producirse en las células durante el crecimiento descontrolado que provocarían dichas mutaciones. Para ello, se llevarán a cabo los siguientes objetivos concretos:

1. Obtención de las células inmortalizadas.
2. Introducción del sistema TET-On con PTEN en las células. Para ello, se hará uso del sistema T-REx™, de Invitrogen. Se transfectarán por separado el plásmido regulador y el de expresión. Se prepararán, además, cinco cultivos: uno se dejará como control, y en los otros cuatro se realizará el siguiente paso.
3. Introducción de la mutación de un gen de interés en cada uno de los 4 cultivos. Para ello, se emplearán dos tratamientos diferentes:
 - a. Transfección estable de un plásmido de alta expresión con los genes que suelen estar amplificados, MYC y PI3KC2.
 - b. Introducción del SNP mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 en los genes KRAS y BRCA1.
4. Comprobación de las alteraciones. En este paso, se probará si la alteración realizada en cada uno de los cultivos ha sido exitosa. Con este fin:
 - a. Se realizará la una RT-PCR cuantitativa para concluir si se sobreexpresa la copia extra del gen que se haya introducido (PIK3CA o MYC).
 - b. Se secuenciará el exón en el que se encuentre la mutación de los genes BRCA1 y MYC.

- Prueba de proliferación y migración celular: se realizarán tres pruebas *in vitro* como modelo para probar la capacidad metastásica, comparando los cultivos con sobreexpresión de PTEN con los que tengan una expresión normal de PTEN.

5. MÉTODO EXPERIMENTAL

A continuación, se detallará el procedimiento con el cual se cumplirán los objetivos mencionados. Además, se podrán consultar el cronograma y el presupuesto del proyecto en los Anexos 1 y 2, respectivamente.

5.1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS INMORTALIZADAS

Para llevar a cabo la prueba de concepto es necesario que las células con las que se vaya a trabajar sean sanas, es decir, que no sean derivadas de tejidos tumorales. Por lo cual, no se pueden usar las habituales líneas celulares con mutaciones en los genes de interés porque son derivadas de tumores ya formados. En este trabajo se propone la elección de la línea celular humana de células epiteliales inmortalizadas con hTERT de mama (hTERT-HME1, ATCC® CRL-4010™). Se cultivarán siguiendo las instrucciones de la empresa ATCC, con el medio MEGM de Lonza/Clonetics Corporation (Kit Catalog N° CC-3150).

5.2. EXPRESION REGULADA DE PTEN CON EL SISTEMA TET-On

Se ha seleccionado el kit T-REx™ System de Invitrogen (Figura 3) para conseguir una línea celular que regule la expresión de PTEN por el método TET-On. Este kit consta, principalmente, del vector regulador pcDNA 6/TR, que expresa el represor de tetraciclina (Tet) regulado por el promotor de alta expresión CMV, y el vector de expresión pcDNA 4/TO, que consiste en un promotor híbrido de CMV y el operador de tetraciclina 2 (TetO2), para una alta expresión del cDNA regulada por tetraciclina. Se

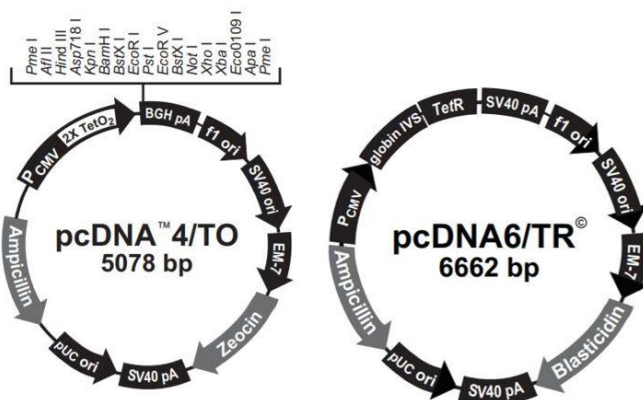


Figura 3: Vector de expresión pcDNA 4/TO y regulador pcDNA 6/TR del sistema T-REx.

obtendrá el vector de expresión con el ORF (para PTEN poder evitar la inhibición llevada a cabo por miR-17) de PTEN ya introducido. Además, para la selección de líneas celulares estables, contiene el gen de resistencia a la Zeocina. La transfección de ambos vectores se hará en distintas fases.

a) Introducción del vector regulador en las células.

Para generar líneas celulares que expresen el sistema TET-On se introducirá el vector regulador pcDNA 6/TR, siguiendo la guía del T-REx™ System accesible en ThermoFisher (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trexsystem_man.pdf). Tras conseguir un stock del plásmido, se procederá a la transfección siguiendo el protocolo de Lipofectamine 2000 Reagent, también en ThermoFisher, un compuesto para facilitar la transfección de la empresa Invitrogen.

Ya que para este proyecto se necesitará que todas las transfecciones sean estables, se expondrán las células transfectadas al antibiótico necesario para la selección 48 horas tras la transfección. En este caso, se incubarán de modo que no cubran más del 50% de la superficie en el medio de selección, con la cantidad de blasticidina necesaria para destruir las células no transfectadas. Se repetirá este último cada 3-4 días, durante los siguientes 10 días.

b) Selección de líneas celulares transfectadas

Siguiendo la guía del plásmido para seleccionar las células que tengan mayor expresión del represor de Tet, se prepararán al menos veinte colonias. Luego se transfectarán estas colonias con el plásmido de control positivo que contiene el gen *lacZ* (pcDNA 4/TO/*lacZ*), y se realizará una medición de la expresión de B-galactosidasa, mediante la técnica western blot. Se seleccionarán las copias que tengan una menor expresión basal y mayor expresión inducida por tetraciclina.

c) Transfección del vector de expresión

Tal y como se remarca en el manual pcDNA 4/TO, debido a que la expresión del gen de interés es dependiente de la expresión del represor de Tet, se seguirá la proporción indicada (6:1) de pcDNA 6/TR:pcDNA 4/TO para conseguir una expresión de PTEN óptima. Se seguirá el mismo protocolo de transfección empleado para el vector regulador. Esta vez, para seleccionar las líneas celulares estables en el medio de selección se incluirán tanto la blasticidina como la zeocina, y se seguirán los plazos marcados con el anterior plásmido.

d) Comprobación de la expresión inducida de PTEN

Una vez se hayan obtenido colonias con el sistema regulador, se probará si sobreexpresan correctamente PTEN en presencia de doxicilina, para lo cual, se seguirá el protocolo de ThermoFisher para los ensayos de expresión génica con las sondas TaqMan. En todos ellos se usarán las células inmortalizadas como control, y se seleccionarán además varias colonias diferentes para escoger las que expresen los genes introducidos en mayor cantidad.

En este manual, se separa el procedimiento en cuatro apartados. Primero, se incubarán las células durante 24 horas en presencia de doxiciclina. Luego, se picarán varios clones de diferentes colonias y se preparará la muestra de cDNA en tres pasos: aislar el RNA total de las células, realizar la transcripción inversa, y por último comprobar la pureza del cDNA. Segundo, se preparará la mezcla de reacción. En ella irán incluidos los primers, que se diseñarán antes de comprar el producto, a partir de la herramienta de diseño de primers de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), sobre la secuencia cDNA de PTEN. Luego, se preparará y cargará la placa y se iniciará la reacción RT-PCR. En el documento se indica el procedimiento concreto de la reacción dependiendo del equipo que se prefiera utilizar. El último paso, que consiste en analizar los resultados haciendo uso de los manuales respectivos al equipo que se haya utilizado.

Para finalizar, se escogerán las colonias que en mayor cantidad expresen PTEN, que serán las que menor valor CT muestren en los resultados.

5.3. ALTERACIÓN DEL GEN DE INTERÉS

Una vez se haya conseguido un cultivo de células inmortalizadas con alta expresión de PTEN, se prepararán cinco subcultivos. Uno se dejará como control, y en los restantes cuatro se introducirán las mutaciones en los genes BRCA1, c-MYC, KRAS y PI3K. Luego, cada uno de esos cinco cultivos se dividirán en dos, para poder utilizar uno de ellos como control, sin sobreexpresar PTEN. Como resultado, al final se conseguirán diez cultivos, que serán: seis de control (uno sin alterar y los otros cinco con solamente PTEN, BRCA1, KRAS, MYC o PIK3CA alterados), y otros cuatro con PTEN amplificado y mutación en los otros cuatro genes.

a) BRCA1

Con el fin de introducir una mutación de BRCA1 en las células se empleará la técnica de edición genética CRISPR/Cas9, con la que se alterarán ambas copias del genotipo salvaje con una inserción de

citocina en la base 5382 (Tabla 1). De esta forma, se conseguirá el genotipo BRCA1 5382insC, una de las dos mutaciones con mayor prevalencia que se encuentran en el gen BRCA1 de las células tumorales (Petrucci et al, 2010).

Para este experimento, la secuencia guía será homóloga del genotipo WT. El sistema CRISPR/Cas9 se transfiere mediante un plásmido, además de la secuencia que se quiera introducir. Este vector (pCas-Guide) se obtendrá desde la empresa OriGene, en el que se pueden observar las dos secuencias claves en el proceso: la secuencia de la guía RNA, que serán los oligos sgRNA diseñados y clonados en el plásmido siguiendo el protocolo accesible en OriGene (pag 20), y la secuencia del gen Cas9 (Figura 4). Los oligos se conseguirán mediante la empresa Sigma-Aldrich. Además, se cotransfectará la secuencia donadora de DNA en forma de oligo, obtenidos a través de SigmaAldrich (Ultramer® DNA Oligo), junto con los LHA y RHA (Left/Right Homologous Arm) para la recombinación homóloga (figura 4).

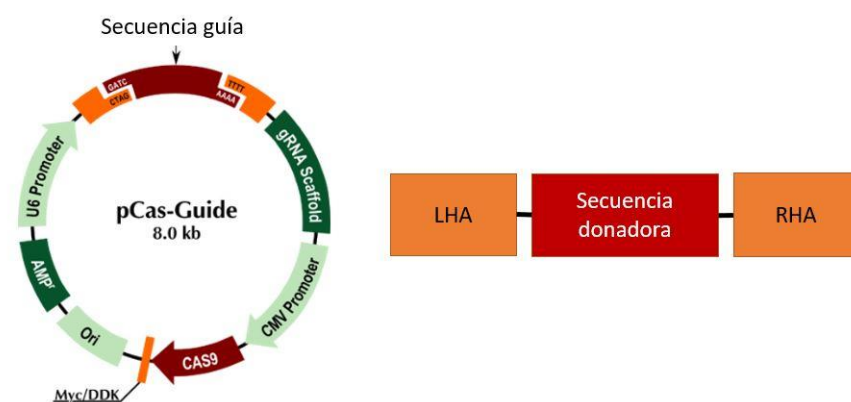


Figura 4: Secuencias para la edición genética. El vector pCas-Guide y la secuencia donadora con los brazos homólogos izquierdo y derecho (LHA y RHA).

En este caso, para la recombinación homóloga del DNA se transfectará la secuencia comprendida entre el 19º exón hasta el codón de terminación de la región codificante de la proteína p220 del gen BRCA1 con el genotipo 5382insC, entre los dos brazos homólogos.

La preparación del vector pCas-Guide, su clonación en bacterias y el cribado se llevarán a cabo siguiendo el protocolo anteriormente mencionado de OriGene. El constructo de los elementos

BRCA1 WT	5'-CACCAAGGTCCAAAGCGAGCAAGAGAATCCCAGGACAGAA-3'
BRCA1 5382insC	5'-CACCAAGGTCCAAAGCGAGCAAGAGAATCCCAGGACAGAA-3'

Tabla 1: Secuencias BRCA1 del genotipo salvaje y 5382insC

necesarios para la recombinación homóloga con la secuencia donadora de DNA también se secuenciará para comprobar si se ha sintetizado correctamente.

b) KRAS

Como ya se ha comentado, el oncogén KRAS es uno de los que más comúnmente se puede encontrar alterado en gran parte de los cánceres, sobre todo los relacionados con el aparato digestivo. En este proyecto se introducirá en las células la mutación c.35G>A (o G12D), que como podemos ver en la Tabla 2, se diferencia con el alelo silvestre en una transversión no sinónima de guanina a adenina, lo que conlleva la sustitución de glicina por ácido aspártico en el 12º aminoácido. Esta mutación representa entre el 33.5–34.4% (Chan, 2017) de las mutaciones de KRAS en el cáncer colorrectal.

Precisamente, haciendo objetivo esta mutación (entre otras) se ha conseguido controlar el crecimiento tumoral usando la técnica CRISPR/Cas9, reemplazándola por la secuencia silvestre (Kim et al, 2018). Por ello, en este experimento se usará la secuencia guía de RNA seleccionada en dicho artículo como secuencia donadora de DNA, y la secuencia del alelo salvaje como sgRNA. Es decir, se seleccionarán las mismas secuencias para provocar el proceso contrario, con lo que se conseguirán células que tengan ambas copias del gen KRAS con la mutación c.35G>A.

La edición genética se realizará con el mismo método utilizado con BRCA1.

KRAS WT	5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCC-3'
KRAS c.35G>A	5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGTGCC-3'

Tabla 2: Secuencias de los genotipos KRAS salvaje y G12D

c) MYC

Se emulará la oncogénesis activada por la desregulación del gen c-MYC provocada por la variación en el número de copias, además de su transcripción constitutiva, mediante la transfección estable del plásmido pcDNA3.1+/C-(K)DY (Figura 5) disponible en GenScript. Este tipo de vector de expresión en mamíferos contiene el promotor CMV, además del gen de resistencia a Neomicina para su selección.

Tal y como aconseja la guía del plásmido, se seguirá el protocolo para la transfección con Lipofectamine 2000 Reagent, ya mencionado anteriormente.

Con el fin de seleccionar las colonias en las que se haya producido la transfección estable, se indica que tras un día de incubación se deberá renovar el medio. 48 horas tras la transfección, se inocularán unas pocas células en el medio con la cantidad de Geneticina necesaria para las células, de modo que las células no cubran más del 25% de la superficie de la placa. Se alimentarán las células con el medio de selección durante los siguientes 3-4 días, hasta que se localicen las colonias resistentes (aproximadamente 10 días). De esta forma, se identificarán las células que hayan integrado el gen de modo permanente en su genoma.

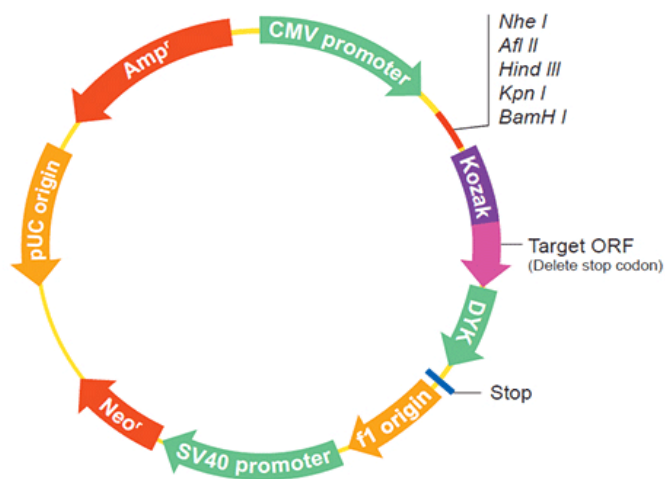


Figura 5: Ilustración del plásmido pcDNA3.1+/C-(K)DY.

d) PIK3CA

En este experimento solamente se introducirá una copia extra de la unidad catalítica. En concreto, se ha elegido el gen PIK3CA (o P110 α), además de por ser el gen de la familia PI3K más comúnmente mutado en el cáncer (Fruman & Rommel, 2014), que la sobreexpresión de este gen es suficiente para activar la ruta PI3K/AKT y, por tanto, potencialmente provocar la oncogénesis (Du et al, 2016; Wang et al, 2014).

Al igual que con c-Myc, se adquirirá el ORF del gen ya insertado en un vector pcDNA3.1+/C-(K)DY (Figura 5). De esta manera, se podrán utilizar los mismos protocolos referenciados anteriormente para la transfección.

5.4. COMROBACIÓN DE LAS ALTERACIONES

Por un lado, en los cultivos que se hayan introducido una copia extra de un gen para provocar su sobreexpresión (es decir, a los que se les han transfectado los genes PI3KCA y MYC), se realizará un western blot, con el anticuerpo DYKDDDDK Tag, que como se puede observar en la Figura 5, es una secuencia acoplada al ORF del gen introducido.

Por otro lado, para comprobar si la edición genética de los genes BRCA1 y KRAS, primero se conseguirán colonias monoclonales. Con este propósito, se llevarán a cabo varias diluciones seriadas en una placa de pocillos hasta que se consiga que quede una sola célula en un pocillo. Para el conteo de las células, se usará un contador de células automático, por ejemplo, el TC20 Automated Cell Counter de Bio-Rad. Una vez se haya conseguido aislar las células en los pocillos, se dejarán incubando durante 4-6 días, hasta que crezcan las colonias monoclonales.

Luego, se aislará el DNA de estas colonias, se amplificará y se secuenciará, con intención de identificar las colonias que contengan ambas copias de sus respectivos genes alteradas. Concretamente, se amplificará mediante PCR el exón completo que contenga la mutación que se haya introducido. En caso del gen BRCA1, se amplificará el exón 19, el cual abarca el espacio entre el nucleótido 160849 y el 160932 (84 nucleótidos). Los primers se volverán a diseñar con el Primer Designing Tool de NCBI. Adicionalmente, para comprobar la edición del gen KRAS se secuenciará su segundo exón, donde se encuentra la mutación G12D del gen KRAS, entre las posiciones 10537 y 10647, es decir, 110 nucleótidos.

5.5. PRUEBA DE MIGRACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Una vez se hayan conseguido los diez cultivos necesarios, es momento de probar si realmente la posibilidad de sobreexpresar PTEN es útil para paliar los efectos que tienen las mutaciones habituales en el cáncer en distintos genes. Con ese fin, se llevarán a cabo tres pruebas *in vitro* para monitorizar el crecimiento y migración celular, por lo que se necesitarán un mínimo de tres copias de cada cultivo. Se comparará cada cultivo con sobreexpresión de PTEN y mutación en otro gen con el cultivo original (sin sobreexpresión de PTEN ni mutación en los genes de interés) y el cultivo con el mismo gen alterado, pero sin la sobreexpresión de PTEN. Por ejemplo: el nivel de proliferación del cultivo con sobreexpresión de PI3KCA se comparará con el cultivo gemelo, pero sin doxiciclina para ver la hipotética mejora de la sobreexpresión de PTEN, y también con el cultivo sin sobreexpresión ni de

PIK3CA ni de PTEN para observar si la sobreexpresión conjunta de ambos genes tiene algún impacto sobre el cultivo original.

a) Ensayo de proliferación celular *in vitro*

Se espera que la velocidad de creación de tumores y por tanto de proliferación celular sea menor en las células que sobreexpresen PTEN, y con el fin de comprobarlo se realizarán las dos pruebas *in vitro*. Primero, se dejarán incubando los diez cultivos (cinco de ellos con doxiciclina) a 37°C con un número de células parecido en cada uno, y se irán contando día a día con ayuda del colorante Trypan blue. Este colorante tiene la particularidad de teñir de azul solamente las células con la pared celular dañada, por lo que solamente las células muertas se verían azules bajo el microscopio óptico (TermoFisher). En caso de que el experimento resulte exitoso, se debería ver un mayor número de células teñidas de azul en el cultivo con PTEN amplificado que en cultivo de células hTERT-HME1 originales y aun mayor que en los cultivos de control con el gen mutado y sin PTEN amplificado.

Además, como complemento para comprobar la proliferación celular, se hará una prueba paralela, y en este caso se distinguirán las células vivas de las muertas mediante el metabolismo. Se empleará el kit de ensayo de toxicología *in vitro* (*In vitro* Toxicology Assay Kit, Sigma- Aldrich), basado en el Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). En el interior de la célula, la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa reduce el MTT en formazan, un compuesto de color azul. Gracias a esto, es posible medir la cantidad de células vivas por actividad enzimática, ya que la intensidad del color azul es proporcional al número de células con actividad deshidrogenasa. Se lleva a cabo midiendo la intensidad del color del formazan con el espectrofotómetro en una longitud de onda de 570nm.

b) Ensayo de migración e invasión celular *in vitro*

Junto con la proliferación, la motilidad de las células cancerígenas es su cualidad más característica. Por lo tanto, para demostrar si con la sobreexpresión de PTEN es posible impedir que las células migren a otros tejidos y que formen una metástasis, se realizará el ensayo de Wound healing. Se trata de una prueba en la que se raya una capa unicelular confluyente, y se mide la velocidad con la que se cierra la herida (Justus et al, 2014). La prueba se repetirá cada día, con el objetivo de observar durante cuánto tiempo es capaz de estabilizar la sobreexpresión de PTEN la migración celular.

6. CONCLUSIÓN, RESULTADOS ESPERADOS Y BENEFICIO DEL PROYECTO

En caso de que se lograra demostrar que lo que propone este proyecto de prueba de concepto es factible, además de la posibilidad de completarlo realizando experimentos *in vivo*, podría suponer un innovador enfoque en la investigación contra el cáncer. Se trataría de impedir que los efectos que algunos genes relacionados con la carcinogénesis tendrían cambiando la regulación de otros genes (que además este cambio de regulación por se impediría la formación de cáncer llevada a cabo por fallos en ese gen) que estén relacionados con su señalización.

Como se ha podido ver, el gen PTEN tiene un rol central en la señalización de varios oncogenes y supresores de tumores, y entre ellos en este proyecto se han seleccionado cuatro que están más directamente relacionados y con los que la sobreexpresión de PTEN tendría el efecto deseado. Estos cuatro (cinco, contando con el propio PTEN) presentan una incidencia de mutaciones muy alta entre los genes que más comúnmente aparecen mutados durante el cáncer, e incluso son responsables directos del inicio de la oncogénesis. Incluso, la ruta PI3K/AKT también es una de las reguladoras de la proteína supresora de tumores p53, aunque no parece que se pueda estabilizar la célula ante una mutación del gen p53 solamente aumentando los niveles de PTEN. Las rutas de señalización que son reguladas por la ruta PI3K/AKT se puede ver en el diagrama de KEGG (Figura 1).

A priori, los beneficios que podría producir un resultado positivo de este experimento serían, como terapia preventiva, una mayor estabilidad de las células ante efectos cancerígenos y menor posibilidad de invasión y metástasis. También se ha comentado que este método puede abrir nuevas perspectivas de investigación. Por ejemplo, llevado a experimentos *in vivo*, con ratones con tendencia a desarrollar cáncer colorrectal (donde KRAS es uno de los principales causantes), o con la mutación G12D de KRAS, se podrían introducir células que sobreexpresen PTEN y observar se es posible, cuanto menos, retrasar el desarrollo tumoral, habiendo observado que *in vitro* es posible. También se podría experimentar con ratones *nude*, como alternativa más simple. Esta prueba consistiría en introducir tumores a estos ratones inmunodeprimidos, con mutaciones en los genes que se quieran investigar, e introducir un vector de alta expresión de PTEN.

También se observa la posibilidad de realizar este mismo método con genes diferentes a PTEN que tengan un rol central en el control del metabolismo o ciclo celular, siendo p53 un claro ejemplo. Además, se podría llegar a combinar la expresión manipulada de dos genes para garantizar la estabilidad celular ante un abanico mayor de causantes del desarrollo del cáncer.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abubaker, J., Bavi, P. P., Al-Harbi, S., Siraj, A. K., Al-Dayel, F., Uddin, S., & Al-Kuraya, K. (2007). PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, *21*(11), 2368.

Asociación Española Contra el Cancer (AECC). ¿Qué es el cáncer? Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer> (Última visita: 05/10/2018)

ATCC®. Células inmortalizadas hTERT-HME1 [ME16C] (ATCC® CRL-4010™). Disponible en: <https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Global/Products/A/B/4/D/CRL-4010.aspx>

Brandmaier, A., Hou, S. Q., & Shen, W. H. (2017). Cell cycle control by PTEN. *Journal of molecular biology*, *429*(15), 2265-2277. doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.004.

Castellano, E., & Downward, J. (2011). RAS interaction with PI3K: more than just another effector pathway. *Genes & cancer*, *2*(3), 261-274. doi: 10.1177/1947601911408079

Chan, E. 2017. KRAS c.35G>A (G12D) Mutation in Colorectal Cancer. *My Cancer Genome*. <https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/kras/34/> (Última actualización: febrero de 2017).

Chen, H., Liu, H., & Qing, G. (2018). Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal transduction and targeted therapy*, *3*(1), 5. <https://www.nature.com/articles/s41392-018-0008-7>

COSMIC - Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. AKT2 gene. Disponible en: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=AKT2> (Última visita: 21/09/2018)

COSMIC - Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. PIK3CA gene. Disponible en: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=PIK3CA#> (Última visita: 21/09/2018)

Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*, *149*(1), 22-35. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.003.

Du, L., Chen, X., Cao, Y., Lu, L., Zhang, F., Bornstein, S., ... & Jin, F. (2016). Overexpression of PIK3CA in murine head and neck epithelium drives tumor invasion and metastasis through PDK1 and enhanced TGFβ signaling. *Oncogene*, *35*(35). doi: 10.1038/onc.2016.1.

Eng C. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome. 2001 Nov 29 [Updated 2016 Jun 2]. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1488/>

Engelman, J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 550. doi: 10.1038/nrc2664.

Espinosa, A., J. Gilbert, J. Fagin. 2015. KRAS c.35G>A (G12D) Mutation in Thyroid Cancer. My Cancer Genome <https://www.mycancergenome.org/content/disease/thyroid-cancer/kras/34/> (Updated February 17).

Fan, H. Y., Shimada, M., Liu, Z., Cahill, N., Noma, N., Wu, Y., ... & Richards, J. S. (2008). Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development*, 135(12), 2127-2137. doi: 10.1242/dev.020560.

Fruman, D. A., & Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 13(2), 140. doi: 10.1038/nrd4204.

Garcia-Cao, I., Song, M. S., Hobbs, R. M., Laurent, G., Giorgi, C., De Boer, V. C., ... & Carracedo, A. (2012). Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell*, 149(1), 49-62. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.030.

GenScript®. ORF cDNA Clones and Custom Clones. PTEN cDNA ORF clone. Accesible en: https://www.genscript.com/gene/homo-sapiens/5728/PTEN.html#NM_000314.6

Hopkins, B. D., Hodakoski, C., Barrows, D., Mense, S. M., & Parsons, R. E. (2014). PTEN function: the long and the short of it. *Trends in biochemical sciences*, 39(4), 183-190. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.006.

Hou, S. Q., Ouyang, M., Brandmaier, A., Hao, H., & Shen, W. H. (2017). PTEN in the maintenance of genome integrity: From DNA replication to chromosome segregation. *BioEssays*, 39(10), 1700082. doi: 10.1002/bies.201700082.

Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). *In vitro* cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (88). doi: 10.3791/51046.

Kaur, M., & Cole, M. D. (2013). MYC acts via the PTEN tumor suppressor to elicit autoregulation and genome-wide gene repression by activation of the Ezh2 methyltransferase. *Cancer research*, 73(2), 695-705. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2522.

Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Última actualización: 25/6/2018). PI3K-AKT signalling pathway. Accesible en: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?mmu04151

Khabele, D. 2017. KRAS c.35G>A (G12D) Mutation in Ovarian Cancer. My Cancer Genome <https://www.mycancergenome.org/content/disease/ovarian-cancer/kras/34/> (Updated February 16).

Kim, W., Lee, S., Kim, H. S., Song, M., Cha, Y. H., Kim, Y. H., ... & Choi, E. J. (2018). Targeting mutant KRAS with CRISPR-Cas9 controls tumor growth. *Genome research*, 28(3), 374-382. doi: 10.1101/gr.223891.117.

Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 157–162. doi:10.1038/35101031

Lovly, C., L. Horn, W. Pao. 2017. KRAS c.35G>A (G12D) Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer. My Cancer Genome <https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/kras/34/> (Updated February 20).

Mahajan, K., & Mahajan, N. P. (2012). PI3K-independent AKT activation in cancers: A treasure trove for novel therapeutics. *Journal of cellular physiology*, 227(9), 3178-3184. doi: 10.1002/jcp.24065.

McLoughlin, N. M., Mueller, C., & Grossmann, T. N. (2018). The therapeutic potential of PTEN modulation: targeting strategies from gene to protein. *Cell chemical biology*, 25(1), 19-29. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.10.009

Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Cesta Incani, U., Del Curatolo, A., Inzerilli, N., ... & Ciuffreda, L. (2015). PTEN: multiple functions in human malignant tumors. *Frontiers in oncology*, 5, 24. doi: 10.3389/fonc.2015.00024.

Minami, A., Nakanishi, A., Ogura, Y., Kitagishi, Y., & Matsuda, S. (2014). Connection between tumor suppressor BRCA1 and PTEN in damaged DNA repair. *Frontiers in oncology*, 4, 318. doi: 10.3389/fonc.2014.00318

Molyneux, E. M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., ... & Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *The Lancet*, 379(9822), 1234-1244. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61177-X.

Mulholland, D. J., Kobayashi, N., Ruscetti, M., Zhi, A., Tran, L. M., Huang, J., Gleave, M., ... Wu, H. (2012). PTEN loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated

from prostate cancer stem/progenitor cells. *Cancer research*, 72(7), 1878-89. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3132.

Murillo, M. M., Zelenay, S., Nye, E., Castellano, E., Lassailly, F., Stamp, G., & Downward, J. (2014). RAS interaction with PI3K p110 α is required for tumor-induced angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 124(8), 3601-3611. doi: 10.1172/JCI74134

National Cancer Institute. Diccionario del Cáncer: definición hamartoma. Accesible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/hamartoma>

National Cancer Institute. ¿Qué es el cáncer? (Última actualización: febrero de 2015). Accesible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference. PTEN gene (última edición 05/2018). Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN> (Última consulta: 20/09/2018)

OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man®. COWDEN SYNDROME 1, # 158350 (Última edición:27/06/2018). Disponible en: <https://omim.org/entry/158350?search=cowden%20syndrome&highlight=syndromic%20cowden%20syndrome> (Última consulta: 20/09/2018)

OriGene. Guia CRISPR/Cas9. Accesible en: https://cdn.origene.com/assets/documents/crispr-cas9/crispr_manual.pdf

Petrucelli, N., Daly, M. B., & Feldman, G. L. (2010). Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine*, 12(5), 245. doi:10.1097/GIM.0b013e3181d38f2f

Sigma-Aldrich. Protocolo de ensayo de toxicología *in vitro* con MTT. Accesible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/tox1?lang=es®ion=ES>

Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., & Dang, C. V. (2015). MYC, metabolism, and cancer. *Cancer discovery*, 5(10), 1024-1039. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0507.

ThermoFisher (2010). Manual de uso de los plásmidos pcDNA™3.1(+) y pcDNA™3.1(-). Accesible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pcdna3_1_man.pdf

ThermoFisher (2010). Protocolo de ensayo de expresion genética TaqMan®. Accesible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041280.pdfAssets/LSG/manuals/pcdna4to_man.pdf

ThermoFisher (2011). Guía pcDNA™4/TO. Accesible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pcdna4to_man.pdf

ThermoFisher (2011). T-REx™ System. Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trexsystem_man.pdf

ThermoFisher (2013). Protocolo de transfección Lipofectamine® 2000 Reagent. Accesible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf

Wang, L., Shan, L., Zhang, S., Ying, J., Xue, L., Yuan, Y., ... & Lu, N. (2014). PIK3CA gene mutations and overexpression: implications for prognostic biomarker and therapeutic target in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *PloS one*, *9*(7), e103021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103021>

Wang, X., Huang, H., & Young, K. H. (2015). The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging (Albany NY)*, *7*(12), 1032. doi: 10.18632/aging.100855

Worby, C. A., & Dixon, J. E. (2014). PTEN. *Annual review of biochemistry*, *83*, 641-669. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-082411-113907>

Xia, P., & Xu, X. Y. (2015). PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *American journal of cancer research*, *5*(5), 1602.

Xiang, T., Jia, Y., Sherris, D., Li, S., Wang, H., Lu, D., & Yang, Q. (2011). Targeting the AKT/mTOR pathway in Brca1-deficient cancers. *Oncogene*, *30*(21), 2443. doi: 10.1038/onc.2010.603

Xiang, T., Ohashi, A., Huang, Y., Pandita, T. K., Ludwig, T., Powell, S. N., & Yang, Q. (2008). Negative regulation of AKT activation by BRCA1. *Cancer research*, *68*(24), 10040-10044. doi: 10.1038/onc.2010.603

Xin, B., Yamamoto, M., Fujii, K., Ooshio, T., Chen, X., Okada, Y., ... & Nishikawa, Y. (2017). Critical role of Myc activation in mouse hepatocarcinogenesis induced by the activation of AKT and RAS pathways. *Oncogene*, *36*(36). doi: 10.1038/onc.2017.114

Zhu, J., Blenis, J., & Yuan, J. (2008). Activation of PI3K/AKT and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(18), 6584-6589. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802785105>

ANEXO 2: PRESUPUESTO

OBJETIVO		PRECIO	VENDEDOR
1	Obtención de células inmortalizadas hTERT-HME1	Contactar con ATCC	ATCC
	Medio MEGM 100mL	130.00 €	ThermoFisher
2	Vector regulador y de expresión del sistema Tet-On	T-REx™ Complete Kit	2,875.00 €
	Transfección	Lipofectamine 2000 reagent 1.5mL	906.00 €
		Medio opti-MEM 100mL	30.05 €
	Comprobación de la transfección	Pierce™ Fast Western Blot Kit	128.00 €
	Comprobación de la expresión regulada de PTEN	TaqMan™ Gene Expression Assay	207.00 €
Primers de PTEN		93.06 €	
3	Edición por sistema CRISPR	pCas-Guide Cloning Kit CRISPR Vector	410.00 €
		RNA oligos de BRCA1	253.00 €
		RNA oligos de PIK3CA	253.00 €
		DNA oligos de BRCA2	112.97 €
		DNA oligos de PIK3CA	112.97 €
	Introducción de MYC y PIK3CA	pcDNA3.1+/C-(K)DYK MYC	140.00 €
		pcDNA3.1+/C-(K)DYK PIK3CA	338.00 €
4	Comprobación de expresión de MYC y PIK3CA	Anticuerpo DYKDDDDK Tag	131.00 €
	PCR y secuenciación de los genes KRAS y BRCA1	Primers de BRCA1	93.06 €
		Primers de KRAS	93.06 €
		Secuenciación	180.00 €
5	Ensayo de proliferación celular	Colorante Trypan blue 100mL	31.80 €
		In Vitro Toxicology Assay Kit, MTT based	599.00 €
TOTAL		7,116.97 €	

